文章编号:1000-5404(2007)01-0047-04

论著

血管内皮生长因子在糖尿病大鼠脉络膜视网膜的表达

周希瑗[1],李 琳[2],江雪丰[1],乔 岗[1] ([1]重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆 400010,[2]武警重庆总队医院眼科,重庆 400061)

提 要:目的 在糖尿病的不同病程中,通过免疫组织化学方法观察血管内皮生长因子(vessel endothelial growth factor, VEGF)在糖尿病大鼠脉络膜中表达的时间、部位,比较正常大鼠及糖尿病大鼠视网膜、脉络膜组织中VEGF的表达情况。**方法** 选取健康雄性Wistar大鼠,采用随机数字表法分成糖尿病组和正常对照组,用链脲佐菌素(STZ)大剂量一次性腹腔注射诱导1型糖尿病模型。取不同组、不同时期大鼠视网膜脉络膜,利用免疫组织化学方法,检测VEGF蛋白质的表达情况。**结果** ①糖尿病1个月组(M1)、血糖恢复组(Mh)大鼠视网膜脉络膜VEGF蛋白质的表达与正常对照组(M0)无明显区别。②糖尿病2个月组(M2)脉络膜可见VEGF蛋白质的阳性表达(33.3%),视网膜上VEGF蛋白质的阳性表达与正常对照组无明显区别。③糖尿病3个月组(M3)脉络膜VEGF蛋白表达阳性(55.6%),视网膜的内核层及节细胞层VEGF蛋白表达阳性与正常对照组(33.3%)比较有明显差异。④糖尿病4个月组(M4)脉络膜VEGF蛋白表达阳性(66.7%),视网膜的内界膜、内核层、外核层及节细胞层VEGF蛋白表达阳性(77.8%)。⑤糖尿病5个月组(M5)脉络膜VEGF蛋白表达阳性(88.9%),视网膜全层均有VEGF蛋白阳性表达(88.9%)。VEGF在脉络膜和视网膜的阳性染色密度随病程逐渐增加($P<0.05$)。**结论** VEGF在大鼠脉络膜视网膜中的表达与病程有关,VEGF蛋白在脉络膜的表达先与视网膜。

关键词: 糖尿病视网膜病变;糖尿病脉络膜病变;免疫组织化学;血管内皮生长因子
中图法分类号: R392.1; R587.2; R770.2 **文献标识码:** A

VEGF expression in choroid of streptozotocin-diabetic Wistar rats

ZHOU Xi-yuan[1], LI Lin[2], JIANG Xue-feng[1], QIAO Gang[1] ([1]Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, [2]Department of Ophthalmology, The Chongqing General Troop of Armed Police, Chongqing 400061, China)

Abstract: Objective To investigate the expression time and the position of VEGF in the choroid of diabetic rats and compare them with the VEGF expression in the choroid and retina of normal rats. **Methods** Healthy male Wistar rats were selected and randomly divided into diabetic group and normal group. Type 1 diabetes rat model was induced by being injected of large-dose streptozotocinum (STZ) into abdominal cavity. The retina and choroid of rats were obtained to detect the VEGF expression by immunohistochemistry at 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th month after diabetes induction. **Results** VEGF expression in retina and choroid of rats was of obvious difference between normal group and one-month diabetic group. In two-month diabetic group, VEGF expression in choroid was positive (33.3%), while VEGF expression in retina was not significantly different with that of normal group. In three-month diabetic group, VEGF expression in choroid was positive (55.6%), and VEGF expression in inner nuclear layer and ganglion cell layer of retina was positive (33.3%). In four-month diabetic group, VEGF expression in choroid was positive (66.7%), and VEGF expression in inner limiting membrane, inner nuclear layer, outer nuclear layer and ganglion cell layer of retina was positive (77.8%). In five-month diabetic group, VEGF expression in choroid was positive (88.9%), and VEGF expression in the whole retina was positive (88.9%). The expression density of VEGF in choroid and retina gradually increased ($P<0.05$). **Conclusion** VEGF expression in choroid and retina of rats is concerned with the pathogenesis of diabetes, and VEGF expression in choroid had precedence over that in retina.

Key words: diabetic retinopathy; diabetic choroidopathy; immunohistochemistry; vessel endothelial growth factor

基金项目: 重庆市科技计划项目(2003-2005)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2003-2005)
作者简介: 周希瑗(1967-),女,重庆市人,主任医师,教授,主要从事眼底病方面的研究。电话:(023)63849075-2096
通讯作者: 李 琳,电话:(023)63849075-2096, E-mail:linda_lilin163.com
收稿日期: 2006-03-03;**修回日期:** 2006-05-10

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)是糖尿病微血管病变在眼部的重要并发症,新生血管形成是其微血管病变的主要标志。随着吲哚青绿脉络膜造影(ICGA)和眼底荧光造影(FFA)的开展,人们发现糖尿病视网膜病变发生的同时脉络膜也有相应的改变[1],20世纪80年代早期Saracco等[2]提出了糖尿病脉络膜病变(diabetic choroidopathy, DC)的概念。DR和DC在病理学上被认为是一类细胞增殖性疾病,其发生发展均与细胞的激活和增殖调控有关,新生血管则是细胞异常增殖的结果。脉络膜新生血管(CNV)也称视网膜下新生血管,是来自脉络膜血管的增殖血管。研究表明多种生长因子参与CNV形成的调控,其中血管内皮生长因子(vessel endothelial growth factor, VEGF)是目前发现作用最强、研究比较成熟的眼部新生血管形成促进因子[3]。本研究观测VEGF在实验性糖尿病大鼠脉络膜视网膜的表达情况,旨在从分子水平研究VEGF在DR和DC中的作用,并通过其表达,探讨脉络膜视网膜出现病变的大致时间及先后关系以及脉络膜病变的特点。

1 材料与方法

1.1 糖尿病动物模型的建立

1.1.1 实验动物 实验动物为封闭群雄性Wistar大鼠60只(重庆医科大学动物实验室提供),体质量180~280 g,用随机数字表法随机分组。实验前禁食12 h,自由饮水。

1.1.2 STZ诱导大鼠糖尿病模型的制备 链脲佐菌素(streptoztocin, STZ,sigma公司),临用前溶于0.05 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 4.5),配置成浓度1.25%的溶液,按60 mg/kg体重一次性腹腔内注射STZ,注射后24~48 h检测定性尿糖和血糖,用ONE TOUCH(中国强生有限公司)血糖仪测血糖,用强生尿糖试纸测尿糖浓度,血糖浓度达16.65 mmol/L尿糖达3+~4+即为模型建立成功。成模后每周测1次定性尿糖、体质量、24 h尿量和饮水量,每月检测1次血糖。1个月后血糖恢复至正常者作为血糖恢复鼠(5只)记为Mh。成模鼠随机分成糖尿病1个月组M1、2个月组M2、3个月组M3、4个月组M4、5个月组M5,每组各9只大鼠。实验中设正常对照组(M0),腹腔注射0.05 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 4.5)。

1.2 取材、固定及石蜡切片制作

分别于1、2、3、4、5个月过量麻醉处死实验组、对照组及血糖恢复组大鼠9只、2只和1只,处死后立即取出眼球,固定于Verhoeff液中,48 h后常规石蜡包埋。连续6 μm切片用于HE染色及免疫组织化学染色。

1.3 免疫组化染色(即用型SABC)

即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。操作步骤:①脱蜡和水化。②3% H_2O_2 1份+蒸馏水10份混合,滴加在切片上,室温静置10 min。③抗原修复。④滴加5% BSA封闭液。⑤滴加一抗Rabbit Anti-VEGF 50 μl, 4 ℃过夜。⑥滴加生物素化山羊抗小鼠IgG。⑦滴加试剂SABC。⑧DAB显色。⑨苏木精复染,脱水、透明、封片、镜检。阴性对照实验,以正常小牛血清代替一抗,其余步骤同上。

1.4 电子计算机图像测定

采用北航病理图像分析系统4.0,视觉图像分析测定各病程糖尿病大鼠视网膜和脉络膜阳性染色密度。

1.5 统计学方法

计算机图像处理数据并以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 正常对照组(M0)及血糖恢复组(Mh)

VEGF免疫阳性反应在M0大鼠视网膜分布于内核层及节细胞层,细胞质呈棕黄色,细胞核未显色。脉络膜无VEGF蛋白质的阳性表达。Mh与M0比较无差别(图1)。

2.2 糖尿病1个月组(M1)

M1大鼠视网膜VEGF蛋白质的阳性表达与M0比较无差别。脉络膜无VEGF蛋白质的阳性表达(图1)。

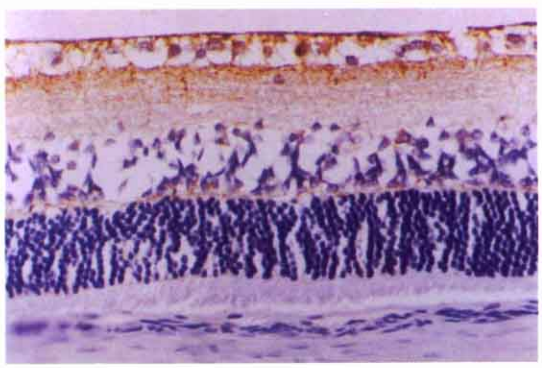


图1 对照组大鼠脉络膜视网膜VEGF免疫组化阳性染色分布于内核层及节细胞层 (SABC×400)

2.3 糖尿病2个月组(M2)

M2大鼠视网膜VEGF蛋白质的阳性表达与M0比较无差别。脉络膜有VEGF蛋白质的阳性表达33.3%(3/9),细胞质呈棕黄色,细胞核未显色(图2)。

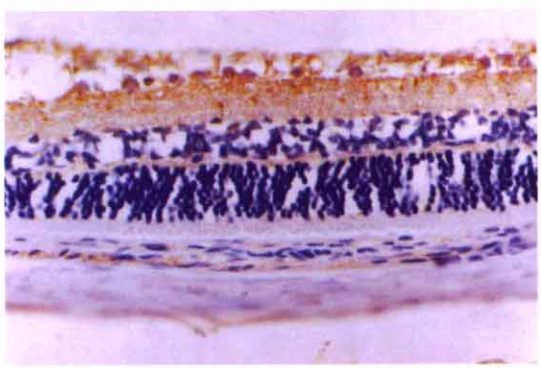


图2 糖尿病2个月组VEGF免疫阳性反应在视网膜无变化,脉络膜有VEGF阳性表达 (SABC×400)

2.4　糖尿病 3 个月组(M3)

M3 有 3 只大鼠视网膜 VEGF 蛋白质的阳性表达 33.3%(3/9)分布于内核层及节细胞层,表达增强,细胞质呈深棕黄色,内核层阳性反应细胞增多,偶见毛细血管的阳性表达。脉络膜 VEGF 蛋白质的阳性表达 55.6%(5/9),细胞质呈深棕黄色(图 3)。

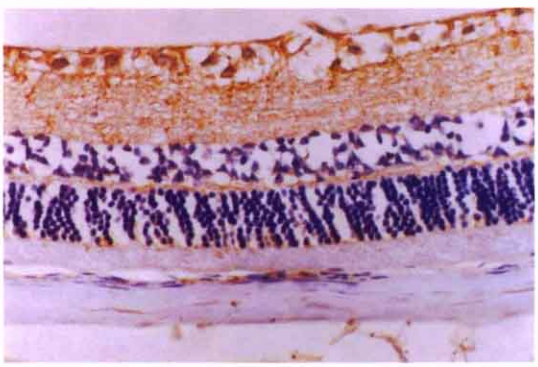


图 3　糖尿病 3 个月组 VEGF 免疫阳性反应在视网膜增强,脉络膜有 VEGF 阳性表达　(SABC ×400)

2.5　糖尿病 4 个月组(M4)

M4 大鼠视网膜 VEGF 蛋白质的阳性表达 77.8%(7/9)分布于视网膜的内界膜、内核层、外核层及节细胞层,表达强,细胞质呈深棕黄色,见毛细血管的阳性表达。脉络膜 VEGF 蛋白质的阳性表达 66.7%(6/9),细胞质呈深棕黄色。

2.6　糖尿病 5 个月组(M5)

M5 大鼠视网膜 VEGF 蛋白质的阳性表达 88.9%(8/9)更加明显,视网膜全层均有 VEGF 蛋白阳性表达。脉络膜 VEGF 蛋白质的阳性表达 88.9%(8/9),细胞质呈深棕黄色(图 4)。

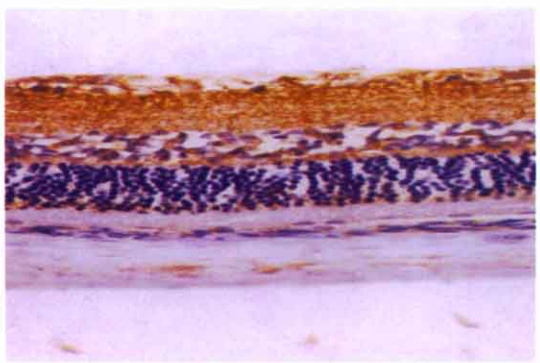


图 4　糖尿病 5 个月组 VEGF 免疫阳性反应在视网膜全层表达,脉络膜 VEGF 阳性表达增强　(SABC ×400)

2.7　免疫组化染色结果计算机图像分析

计算机图像分析系统检测脉络膜、视网膜 VEGF 的阳性染色面密度。糖尿病 1、2 个月组与对照组视网膜阳性染色无差别。糖尿病脉络膜、视网膜 VEGF 阳性染色密度随病程逐渐增加($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1　Wistar 大鼠对照组和糖尿病组不同时间段 VEGF 阳性染色密度($\bar{x}\pm s$)

	1 个月	2 个月	3 个月	4 个月	5 个月
视网膜					
正常组	11.9 ±0.86	11.7 ±0.88	12.0 ±0.98	11.1 ±096	10.9 ±1.86
实验组	11.1 ±0.86	11.4 ±0.69	25.0 ±1.16[a]	35.8 ±1.04[a]	44.8 ±1.21[b]
脉络膜					
实验组	0	8.57 ±0.57	15.9 ±0.92[c]	26.5 ±1.32[d]	38.1 ±1.66[d]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与正常组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$,与糖尿病 2 个月组比较

3　讨论

VEGF 与 DC 和 DR 有着密切关系,视网膜的许多细胞都可产生 VEGF。VEGF 是目前公认的功能最强的新生血管形成促进因子。它可以增加微血管的通透性、刺激内皮细胞分裂、增加组织因子和某些蛋白酶的产生。VEGF 通过内皮细胞的细胞内信号转导途径,促进血管内皮细胞增殖、迁移,从而促进新生血管的生成。本实验利用 STZ 诱导大鼠糖尿病模型以免疫组化方法研究 VEGF 在糖尿病大鼠脉络膜视网膜中的表达,以探讨脉络膜视网膜出现病变的大致时间及先后关系以及脉络膜病变的特点。

研究表明,血糖恢复鼠的 VEGF 表达与正常对照鼠相同,证明 VEGF 表达非 STZ 对脉络膜视网膜毒性作用所致,而与糖尿病脉络膜视网膜病变有关。VEGF 免疫阳性反应在正常大鼠视网膜中表达较弱,且局限于视网膜内核层及节细胞层的部分细胞的细胞质,正常大鼠脉络膜中无阳性表达。而在糖尿病大鼠,VEGF 蛋白质的阳性表达比正常大大增强,并随病程的延长有逐渐增强的趋势,表达的空间范围亦有所扩大。在病程 2 个月始,脉络膜出现阳性反应,而在病程 3 个月始,视网膜 VEGF 蛋白质的阳性表达明显增强,且毛细血管内皮细胞也出现阳性反应。本实验在正常大鼠视网膜内核层及节细胞层的部分细胞表达 VEGF,可能提示 VEGF 对正常大鼠的脉络膜视网膜血管的作用来自内核层及节细胞层的旁分泌作用,而在糖尿病状态下 VEGF 在脉络膜视网膜血管内皮细胞中有较强的表达,提示在糖尿病中内皮细胞的活性大大加强。从而推测糖尿病时 VEGF 对脉络膜视网膜血管内皮细胞的作用有一部分来自其自分泌作用,而且脉络膜的自分泌作用早于视网膜,致 VEGF 在脉络膜血管内皮细胞过度表达、失衡,导致 DC 的发生。由此推测可能脉络膜血管发生病变早于视网膜病变。有学者通过 ICGA

观察发现 DC 早于 DR 的改变，甚至 DC 出现在没有任何视网膜血管改变之前[4]，与本实验的结果有相似之处。

DC 还可能受其他因素的影响，比如脉络膜的血管周围还分布了许多的副交感神经纤维，脉络膜的血流还受神经内分泌的影响，导致脉络脉血流灌注及阻力的变化。Sakurai 等[5]提出糖尿病脉络膜病变实质可能包含糖尿病的神经病变和毛细血管病变。这可以部分解释为什么通过 ICGA 和 FFA 等检查未发现任何视网膜或脉络膜改变的患者，眼部血流动力学会发生灌注减少和阻力增大的变化[6]，并且这类患者大多会发生糖尿病视网膜或脉络膜病变。

糖尿病脉络膜病变目前国内对其研究较少。本研究通过建立糖尿病的动物模型观察糖尿病大鼠脉络膜中 VEGF 的表达，初步探讨了糖尿病脉络膜的改变与其视网膜的改变之间的时间关系，发现脉络膜的改变略早于视网膜的改变。这与临床上通过 ICGA 和 FFA 的观察基本一致。但是，糖尿病脉络膜病变同糖尿病视网膜病变一样是一个较复杂的过程，本研究结果仅提供一个初步的线索，有待更深一步的研究。

参考文献：

[1] Amalric P. Evolution of the conceptualization of diabetic retinopathy [J]. Bull Acad Natl Med, 1991, 175(7): 1017-1032.

[2] Saracco J B, Gastaud P, Ridings B, *et al*. Preliminary study on diabetic choroidopathy [J]. Bull Soc Ophtalmol Fr, 1982, 82(3): 451-454.

[3] 张 雷，王康孙，王 玲，等. PEDF 和 VEGF mRNA 在实验性脉络膜新生血管组织中的表达[J]. 眼科新进展，2004，24(2)：84-87.

[4] 阴正勤，孟晓红，余 涛，等. Ⅱ型糖尿病患者吲哚青绿血管造影的观察[J]. 中华眼底病杂志，2001，16(3)：160-161.

[5] Sakurai M, Higashide T, Takeda H, *et al*. Characterization and diabetes-induced impairment of nitric oxide synthase in rat choroid[J]. Curr Eye Res, 2002, 24(2): 139-146.

[6] Dimitrova G, Kato S, Tamaki Y, *et al*. Choroidal circulation in diabetic patients[J]. Eye, 2001, 15(Pt 5): 602-607.

（编辑 薛国文）

（上接42页）

液内的铅大部分分布于红细胞膜上，可造成红细胞代谢障碍从而导致溶血性贫血。

病初常有乏力等不适，之后很快出现腹痛、贫血、黄疸等症状。腹痛常为持续性，较剧烈，以脐周多见，一般止痛药物难以控制，但多数腹部较柔软，无固定压痛点，无肌卫及反跳痛等体征。个别患者可发生麻痹性肠梗阻，或因腹痛剧烈而与外科急腹症一时难以鉴别[1]。本例患者与其妻子都有剧烈腹痛，并伴有进行性贫血，但无腹膜炎表现。其妻发病先于丈夫16 d，Hb迅速下降（由130 g/L降至67 g/L），因剧烈腹痛、腹胀、无排便、曾以"肠梗阻"急诊手术，术后症状仍无缓解。然后急查血铅506 μg/L，尿铅512 μg/L。经依地酸二钠钙驱铅治疗后，自觉症状消失，血铅降为42 μg/L，Hb升至98 g/L。2人均痊愈出院。因此我们认为，当患者出现腹痛剧烈难忍，而腹部体征并不明显，且"喜动不喜静"、症状与体征呈"反比例关系"等特征时，应考虑有非外科急腹症的可能性。

本例病史中询问不出任何重金属接触史，周围环境中也无类似污染源，因此诊断时不易想到铅中毒。但夫妻2人前后相继发病，其症状、体征完全相同，说明两人可能曾经同时共食过某种足以致病的污染物。根据2人同有剧烈腹痛、不明原因的血色素迅速下降等特征，提示铅中毒的可能性极大。诊断思路明确后，急查血铅及尿铅2人均增高，用依地酸二钠钙驱铅治疗后症状消失。对本组病例（丈夫）之所以能够在短时间内最先做出正确的诊断，是基于我们对2人病史相关性特点的重视以及由此而实施的诊断思路的调整。经反复查找，最后证实所服滋补中药虫草中混有大量铅，可能是铅在碾磨成粉状过程中被误加入，亦不排除地摊药贩故意所为。故集市购买时，应予警惕。

治疗主要采用驱铅疗法，依地酸二钠钙是目前本病最有效且常用的药物，用量及疗程应根据临床症状及血、尿铅改变而选择。

关键词：铅中毒；急腹症；依地酸二钠钙

中图法分类号：R595.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 史懋功，崔 毅，李友好. 急性铅中毒误诊27例分析[J]. 中国误诊学杂志，2002，2(9)：1381-1382.

[2] 张凤珍，石道亮，张国庆. 亚急性铅中毒二十四例误诊原因分析[J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2001，19(6)：481.

[3] 姜文忠，赵 晖，张凤林，等. "医源"性亚急性铅中毒4例误诊分析[J]. 中国工业医学杂志，2004，17(6)：352.

[4] 周忠明. 服中药致急性铅中毒3例报告[J]. 青岛医药卫生，2004，36(3)：196.

[5] 吴 菲，黄荣华. 一起自制中药丸致急性铅中毒40例病例分析[J]. 环境与职业医学，2003，20(4)：274，279.

[6] 成戎用，李黔宁，刘 勇，等. 6例急性四乙基铅中毒临床表现分析[J]. 第二军医大学学报，2004，26(11)：980，983.

（编辑 龙 亮）